

METHOD FOR IMMOBILIZATION AND MEASUREMENT OF SPECIFIC COMPLEX

Publication Number: 2001-305137 (JP 2001305137 A) , October 31, 2001

Inventors:

- ISHIKAWA EIJI

Applicants

- ISHIKAWA EIJI
- SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD

Application Number: 2000-118848 (JP 2000118848) , April 20, 2000

International Class:

- G01N-033/538
- C12M-001/00
- C12N-015/09
- C12Q-001/68
- G01N-033/543

Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method wherein, after a complex which contains a substance to be measured is formed in a reaction solution, the complex is bonded to an insoluble carrier with good efficiency so as to be measured and to provide a method wherein a complex which is formed once in a carrier is dissociated with good efficiency. **SOLUTION:** A substance which has an activity to form the complex specifically to the substance to be measured and to which a specific electrostatic group is introduced in advance is reacted with the substance, to be measured, in a solution to be inspected. The complex is formed in the solution. By an electrostatic action which uses an electric charge by the introduced electrostatic group, the complex is bonded to the insoluble carrier so as to be measured. In addition, the surface of a carrier in which a complex is formed via an electrostatic substance is brought into contact with a high-ionic-strength solution, and the complex is dissociated into the solution. As compared with a capturing method or a dissociating method using an intermolecular action by van der Waals in conventional cases, a reaction efficiency is enhanced, a serum interference is suppressed in a capturing reaction, and the reaction time is shortened in a dissociating reaction. This invention can be adapted to an existing ultrahigh-sensitivity measuring technique. COPYRIGHT: (C)2001,JPO

JAPIO

© 2006 Japan Patent Information Organization. All rights reserved.

Dialog® File Number 347 Accession Number 7077492

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-305137

(P2001-305137A)

(43) 公開日 平成13年10月31日 (2001. 10. 31)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
G 0 1 N 33/538		G 0 1 N 33/538	4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/543	5 0 1 B
G 0 1 N 33/543	5 0 1	C 1 2 N 15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 11 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-118848(P2000-118848)

(22) 出願日 平成12年4月20日 (2000. 4. 20)

(71) 出願人 595080669

石川 榮治

宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 石川 榮治

大阪府豊中市緑丘4丁目14番7号

(74) 代理人 100107629

弁理士 中村 敏夫

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 HA19

4B029 AA07 AA23 BB20 FA12

4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR55

QR82 QS03

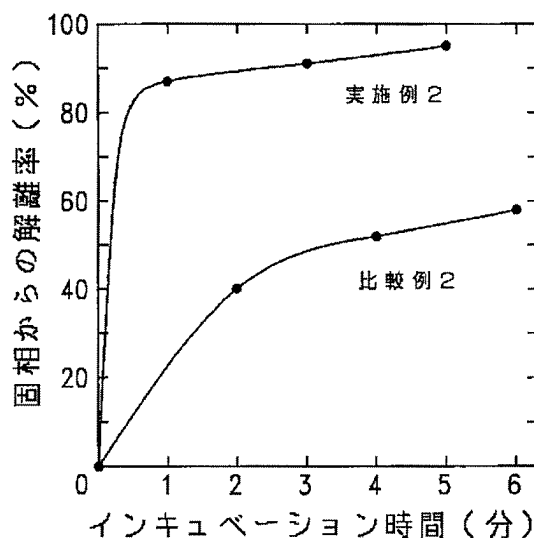
(54) 【発明の名称】 特異的複合体の固定化方法および測定方法

(57) 【要約】

【課題】 反応液中で測定すべき物質を含む複合体を形成させた後に、該複合体を効率良く不溶性担体と結合させて測定する方法を提供する。さらには、一旦担体に形成された複合体を効率よく解離させる方法を提供する。

【解決手段】 被検液中の測定すべき物質に対して、該測定対象物質と特異的に複合体を形成する活性を有し且つあらかじめ特定の帯電性基が導入された物質を反応させて溶液中で複合体を形成させ、その後、導入された帯電性基のもつ電荷を利用した静電的作用により、当該複合体を不溶性の担体に結合させ測定する。さらには、帯電物質を介して複合体が形成された担体表面を高イオン強度の溶液と接触させることにより、該複合体を溶液中に解離させる。従来のファン・デル・ワールスによる分子間作用を利用した捕捉方法あるいは解離方法と比べてそれぞれ反応効率が向上し、捕捉反応では血清干渉が抑制され、また解離反応では反応時間が短縮された。さらに、本発明は既存の超高感度測定技術への適応が可能であった。

図1 免疫複合体の固相からの解離反応における本発明法と従来法の解離速度の比較



【特許請求の範囲】

【請求項1】測定すべき物質（測定対象物質）及びそれと特異的に結合する物質（特異的結合物質）から得られる複合体を不溶性の担体に捕捉し固定化する方法であって、下記工程（A）または（A'）を含むことを特徴とする、測定対象物質の固定化方法。

（A）：正または負の帯電性基を導入した特異的結合物質（帯電特異的結合物質）と測定対象物質から、正または負に荷電した複合体（帯電複合体）を形成させ、これを固定化反応溶液中で、負または正に荷電した不溶性の担体（帯電固相）に捕捉する工程。

（A'）：正または負の帯電性基を導入した特異的結合物質（帯電特異的結合物質）を負または正に荷電した不溶性の担体（帯電固相）に結合させ、これに固定化反応溶液中で、測定対象物質を捕捉する工程。

【請求項2】特異的結合物質が、抗原、抗体または核酸プローブである請求項1の固定化方法。

【請求項3】帯電特異的結合物質が、強塩基性（ pK_b が9以上）または強酸性（ pK_a が4以下）である請求項1または2の固定化方法。

【請求項4】帯電固相が、強塩基性（ pK_b が9以上）または強酸性（ pK_a が4以下）である請求項1～3の固定化方法。

【請求項5】特異的結合物質が有する正または負の荷電を示す帯電性基が、スルホン酸基であり、帯電固相が、DEAE（ジエチルアミノエチル）基を有し、固定化反応溶液が pH 6～8、イオン強度0.2～0.8である請求項1～4の固定化方法。

【請求項6】請求項1～5の固定化方法にて捕捉された帯電複合体を当該複合体に導入された標識により測定する測定対象物質の測定方法。

【請求項7】測定対象物質と特異的結合物質を含む複合体を少なくとも一回、不溶性の担体上に形成および解離させる工程を含む測定方法であって、下記工程（A）と（B）、または（A'）と（B）を含むことを特徴とする測定対象物質の測定方法。

（A）：正または負の帯電性基を導入した特異的結合物質（帯電特異的結合物質）と測定対象物質から、正または負に荷電した複合体（帯電複合体）を形成させ、これを固定化反応溶液中で、負または正に荷電した不溶性の担体（帯電固相）に捕捉する工程。

（A'）：正または負の帯電性基を導入した特異的結合物質（帯電特異的結合物質）を負または正に荷電した不溶性の担体（帯電固相）に結合させ、これに固定化反応溶液中で、測定対象物質を捕捉する工程。

（B）：工程（A）または工程（A'）の後、帯電固相から帯電複合体を解離させる工程。

【請求項8】イオン強度が0.5～3の電解質溶液（解離反応溶液）中で帯電複合体を帯電固相から解離させる工程（B）を含むことを特徴とする請求項7記載の測定

方法。

【請求項9】解離反応溶液が1.0～2.0mol/Lの塩化ナトリウム溶液である請求項8記載の測定方法。

【請求項10】解離された帯電複合体を当該複合体に導入された標識により測定する請求項7記載の測定方法。

【請求項11】工程（B）の後、帯電複合体を別の固相に再結合させる工程（C）を含む請求項7記載の測定方法。

【請求項12】別の固相が帯電固相である請求項11記載の測定方法。

【請求項13】請求項1～5記載の固定化方法または6～12記載の測定方法を行うための帯電特異的結合物質または間接的帯電特異的結合物質を含む試薬。

【請求項14】請求項6～12記載の測定を行うための測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、被検液中の測定対象物質の検出に有用な測定対象物質の固定化方法及び測定方法に関する。より詳細には、被検液中のタンパク、ハプテン、抗体などの免疫学的測定法あるいは核酸のハイブリダイゼーションアッセイ、およびそのための測定用試薬、測定用キットに関する。

【0002】

【従来の技術】抗原、抗体や核酸、ホルモンなど微量生体成分の量を測定するのに、測定対象物質と特異的に結合する物質が被覆された不溶性の担体（以下固相ともいう）に測定対象物質を結合させ測定する方法は、高感度で特異性が高く、従来より様々な物質の測定に応用されている。最も普遍的に用いられている測定系は、固相の表面に抗原物質あるいは抗体が被覆されており、被検液中の特異的抗体あるいは抗原物質と固相上で反応させて測定する免疫学的測定法であり、石川と加藤によるラット肝オルニチン δ -アミノトランスフェラーゼの測定〔スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー（Scand. J. Immunol.）、第8巻（補冊7）、第43-55頁（1978）〕など古くから数多くの報告がなされている。

【0003】また、固相に核酸（ポリヌクレオチド）が被覆されており、被検液中の相補的な配列をもつ核酸と固相上で特異的にハイブリッドを形成させて測定する方法もよく用いられる手法である。例えば、ヴァータネン（Virtanen）らによる尿中のサイトメガロウィルスの測定〔ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクrobiology（J. Clin. Microbiol.）第20巻、第1083-1088頁（1984）〕などが報告されている。さらに、受容体で被覆された固相に被検液中のリガンドを結合させて測定する方法〔ガルゴスキー（Gargosky）ら、ジャーナル・オブ・エンドクリノロジー（J. Endocrinol.）、第127巻、第383-390頁（1990）〕やレクチン分子が被覆された固相に糖

鎖物質を結合させて測定する方法〔永田ら、テューマー・バイオロジー (Tumour Biol.)、第12巻、第35-44頁 (1991)〕などが報告されている。

【0004】また、測定対象物質を含む特異的複合体を固相に結合させて測定する方法を更に改良し、抗原物質あるいは抗体を超高感度に測定する方法として、免疫複合体転移測定法という技術が本発明者らによって開発されている〔日本特許第2606722号、同2657672号、E. Ishikawa, "Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay"; Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 27, (1999), Ed.: S. Pillai and P. C. van der Vliet, Elsevier, Amsterdam〕。この技術は、測定対象物質を2種類以上の固相間で移動させたのち、固相上の免疫複合体を測定することを特徴とする。すなわち、測定対象物質を含む免疫複合体を (1) 固相へ結合させ、(2) 特異的に固相から解離させ、(3) 更に別の固相に再結合させる、という工程を経ることによって被検液に含まれる夾雑物質が除かれ、測定系の非特異的信号の原因が減少する結果、検出感度が著しく向上することが知られている。さらに、本発明者らは、上記免疫複合体転移測定法の変法として、測定対象物質を含む免疫複合体を固相から解離させた後、液相中で免疫複合体の測定を行う方法も開発している〔特開平2-198361号〕。この方法は、別の固相を用いる方法に比べて検出感度は若干低下する場合はあるものの、迅速かつ簡便に高感度測定が可能である。

【0005】これらの測定対象物質と特異的に結合する物質を用いる測定方法においては、一般的に反応液相中で生じた複合体を固定化して、あるいは固相表面上で生成した複合体を測定する。前者では、通常、液相中の複合体を固定化する際に別途結合系を介在させることが多い。例えば、測定すべき抗体物質と特異的に結合する抗原物質にあらかじめビオチンが導入されており、液相で形成された免疫複合体をアビジン化固相に結合させて測定する方法〔特開昭63-229368〕や同じく測定すべき抗体物質と特異的に結合する抗原物質にあらかじめDNP (ジトロフェニル基) が導入されており、液相で形成された免疫複合体を抗DNP-BSA抗体不溶化固相に結合させて測定する方法〔特開平1-312464〕などが報告されている。このような複合体の固定化のために使われる結合系は、ビオチン-アビジン系やDNP-抗DNP抗体系のようなアフィニティーペアであり、ファン・デル・ワールス力に基づく分子間力により結合するものである。

【0006】一方、生化学の分野では、静電力 (クーロン力) を介した結合、即ち、イオン結合も、核酸あるいは免疫複合体と固相の結合に用いられる。この分子間力は距離の2乗に逆比例した相互作用を及ぼすため、イオン結合反応はアフィニティー結合より迅速に行われる。しかし、アフィニティー結合よりは、特異性が小さい (電荷の

有るものは何でも結合する結果、夾雑物質の影響を受けやすい)、比較的結合が弱い (複合体の電荷が小さいと解離しやすい) という特性があり、これまで、本技術分野において、測定対象物質を含む複合体の固定化に用いられることは無かった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 前述のビオチン-アビジン系やDNP-抗DNP抗体系のようなアフィニティー結合は、ファン・デル・ワールス力に基づく分子間力で結合するが、この力は一般に両物質が非常に近接した状態では強い相互作用を示す一方、両物質が少しでも離れた状態では距離の6乗に逆比例してその相互作用が減弱する。従って、この結合は複合体の濃度が低く、夾雑物質が大量に共存する溶液中では、反応効率が悪く、固定化に時間がかかる傾向にある。また、いったん結合したものを解離させる場合も効率が悪くなる。イムノアッセイやハイブリダイゼーションアッセイにおいて、より迅速かつ効率的に測定対象物質を含む複合体を固定化し、あるいは解離して測定する方法が望まれていた。本発明の目的は、被検液由来の測定対象物質の効率的な固定化方法、及び測定方法 (測定用試薬、測定用キット) の提供である。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、イムノアッセイや核酸のハイブリダイゼーションアッセイのように、測定対象物質と特異的結合物質との複合体を固定化する測定方法において、特異的結合物質にあらかじめ特定の帯電性基を導入しておき、その帯電性基の示す電荷と静電的結合を起こすような電荷をもつ固相とを適当な条件下で反応させることにより、被検液由来の夾雑物質の干渉をほとんど受けずに複合体を効率良く固相に結合させ得ることを見出し、本発明に至った。更に、免疫複合体転移測定法等における免疫複合体の固相への捕捉及び当該固相からの解離反応においても、本発明の原理の適用に成功した。

【0009】すなわち、本発明は、下記の特徴を有するものである。

[1] 測定すべき物質 (測定対象物質) 及びそれと特異的に結合する物質 (特異的結合物質) から得られる複合体を不溶性の担体に捕捉し固定化する方法であって、下記工程 (A) または (A') を含むことを特徴とする、測定対象物質の固定化方法。

(A) : 正または負の帯電性基を導入した特異的結合物質 (帯電特異的結合物質) と測定対象物質から、正または負に荷電した複合体 (帯電複合体) を形成させ、これを固定化反応溶液中で、負または正に荷電した不溶性の担体 (帯電固相) に捕捉する工程。

(A') : 正または負の帯電性基を導入した特異的結合物質 (帯電特異的結合物質) を負または正に荷電した不溶性の担体 (帯電固相) に結合させ、これに固定化反応

溶液中で、測定対象物質を捕捉する工程

[2] 特異的結合物質が、抗原、抗体または核酸プローブである[1]の固定化方法。

[3] 帯電特異的結合物質が、強塩基性（ pK_b が9以上）または強酸性（ pK_a が4以下）である[1]または[2]の固定化方法。

[4] 帯電固相が、強塩基性（ pK_b が9以上）または強酸性（ pK_a が4以下）である[1]～[3]の固定化方法。

[5] 特異的結合物質が有する正または負の荷電を示す帯電性基が、スルホン酸基であり、帯電固相が、DEAE（ジエチルアミノエチル）基を有し、固定化反応溶液が $pH6\sim8$ 、イオン強度 $0.2\sim0.8$ である[1]～[4]の固定化方法。

[6] [1]～[5]の固定化方法にて捕捉された帯電複合体を当該複合体に導入された標識により測定する測定対象物質の測定方法。

[7] 測定対象物質と特異的結合物質を含む複合体を少なくとも一回、不溶性の担体上に形成および解離させる工程を含む測定方法であって、下記工程（A）と（B）、または（A'）と（B）を含むことを特徴とする測定対象物質の測定方法。

（A）：正または負の帯電性基を導入した特異的結合物質（帯電特異的結合物質）と測定対象物質から、正または負に荷電した複合体（帯電複合体）を形成させ、これを固定化反応溶液中で、負または正に荷電した不溶性の担体（帯電固相）に捕捉する工程。

（A'）：正または負の帯電性基を導入した特異的結合物質（帯電特異的結合物質）を負または正に荷電した不溶性の担体（帯電固相）に結合させ、これに固定化反応溶液中で、測定対象物質を捕捉する工程。

（B）：工程（A）または工程（A'）の後、帯電固相から帯電複合体を解離させる工程。

[8] イオン強度が $0.5\sim3$ の電解質溶液（解離反応溶液）中で帯電複合体を帯電固相から解離させる工程

（B）を含むことを特徴とする[7]記載の測定方法。

[9] 解離反応溶液が $1.0\sim2.0\text{mol/L}$ の塩化ナトリウム溶液である[8]記載の測定方法。

[10] 解離された帯電複合体を当該複合体に導入された標識により測定する[7]記載の測定方法。

[11] 工程（B）の後、帯電複合体を別の固相に再結合させる工程（C）を含む[7]記載の測定方法。

[12] 別の固相が帯電固相である[11]記載の測定方法。

[13] [1]～[5]記載の固定化方法または[6]～[12]記載の測定方法を行うための帯電特異的結合物質または間接的帯電特異的結合物質を含む試薬。

[14] [6]～[12]記載の測定を行うための測定キット。

【0010】以下、本発明における用語の意味あるいは定義について説明する。「測定すべき物質（測定対象物質）」とは、本発明の測定法で定量しうる生理活性物質を意味し、これまで、タンパク質のイムノアッセイや核

酸ハイブリダイゼーションなど、固相測定法において測定され得た物質であれば特に限定されない。例えば、抗原、抗体、核酸（DNA、RNA）、糖質、脂質およびリガンドなどである。抗原物質としては、例えば、HIVのコア抗原やHBVの表面抗原のようなウイルス抗原、インスリンや成長ホルモン（GH）のような蛋白性ホルモン類、C-反応性蛋白（CRP）やフィブリン分解物のような血漿蛋白類、 α -フェトプロテイン（AFP）や癌胎児性抗原（CEA）のような腫瘍マーカー類あるいはチロキシンやバソプレッシンのようなハプテン類等が挙げられる。また、抗体としては、抗HIV抗体や抗HBV抗体のような抗ウイルス抗体、抗核抗体や抗サイログロブリン抗体のような自己抗体、抗インターフェロン抗体や抗成長ホルモン抗体のような抗蛋白製剤抗体あるいはアレルギー特異IgE等が挙げられる。一方、核酸としては、フェニルketon尿症や家族性アミロイドポリニューロパチーのような遺伝性疾患のDNA、HIVや結核菌のような病原体のRNAまたはDNA、神経芽細胞腫のN-mycやパーキットリンパ腫のC-mycのような癌遺伝子のDNA等が挙げられる。さらに、糖質としては糖化ヘモグロビンA1Cやヒアルロン酸等が、脂質としてはリポ蛋白（a）等が挙げられる。その他リガンドとしては、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃等が挙げられる。

【0011】これらの測定対象物質は、生体由来の被検液（検体）中に存在し、本発明の固定化方法や診断方法で検出される。被検液としては、血清、血漿、唾液、尿、喀痰、髄液、リンパ液等の生体液あるいは細胞培養液、抽出液、懸濁液など測定対象物質を含む各種緩衝液等が挙げられる。当該分野で周知の概念であり、現在までに測定された検体であれば特に限定されない。

【0012】「測定対象物質と特異的に複合体を形成する物質（特異的結合物質）」とは、測定対象物質に選択的に高い親和性を示す物質を意味する。例えば、測定対象物質が抗原物質の場合は特異的抗体等が、抗体の場合は抗原または抗抗体等が、核酸の場合は相補的なヌクレオチド配列をもつDNAあるいはRNA等が、糖質の場合はレクチン等が、あるいはリガンドの場合はレセプター等が挙げられる。なお、本明細書の「特異的結合物質」とは、測定系に影響を与えないウシ血清アルブミン、抗体などの蛋白質（キャリアー）が結合あるいは非特異的な核酸配列が付加したものも含む概念である。さらに、特異的結合物質には、後の工程で複合体の測定に用いるための標識やハプテン分子を導入しておいてもよい。

【0013】「正または負の帯電性基」とは、反応溶液中で電離して、正または負の荷電を示す物質を意味する。例えば、正の帯電性基としては、アミノ基、アミノエチル基、グアニジル基が、負の帯電性基としては、スルホン酸基、カルボキシル基、カルボキシルメチル基、リン酸基等が挙げられる。また、分子内に様々な帯電性基を有

するが分子全体として一定の電荷を示す蛋白質や核酸のような天然物質を用いてもかまわない。そのような物質の例としては、溶液中で強い負の電荷を示すヒストン蛋白等が挙げられる。これら帯電性基は測定対象物質と下記の帯電特異的結合物質の反応を阻害しないものであればいかなる物質でもよいし、導入される電荷の量にも制限はない。

【0014】「帯電特異的結合物質」とは、特異的結合物質に正又は負の帯電性基を導入したものである。正の帯電性基を導入した場合は、帯電特異的結合物質は、強塩基性（ pK_b が9.0以上）、負の帯電性基を導入した場合は強酸性（ pK_a が4.0以下）になるように調整されるのが好ましい。例えば、負の帯電性の強いスルホン酸基を複数個導入する方法は、好適な方法の1つである。特異的結合物質に特定の帯電性基を導入する方法は、特異的結合物質と測定対象物質の結合を阻害しない限り特に制限はない。帯電性基を特異的結合物質に直接導入してもよいし、あらかじめ他の物質に導入した後にその物質と特異的結合物質を結合させてもよい。直接導入する方法としては、特異的結合物質のもつアミノ基やカルボキシル基等の官能基を利用して共有結的に反応させる方法等が挙げられる。測定対象物質を含んで形成される複合体中のいずれかの成分と特異的に結合し且つ溶液中で正または負の帯電性基が導入された物質（以下、間接的帯電特異的結合物質）も本明細書における「帯電特異的結合物質」の一種である。

【0015】「不溶性担体」とは、反応液中の測定対象物質を結合させるための固相を意味し、イムノアッセイなど本発明の技術分野において周知の概念である。通常使用される材質としては、ポリスチレン、ポリアクリル、ポリカーボネート、ポリメタクリエート、テフロンTM、セルロース膜、紙、ガラス、アガロース、フェライト、ラテックス（天然ゴム）等が挙げられる。形状も特に限定されず、例えば、ビーズ、プレート、スティック、ゲル、樹脂、シート、カプセル等が挙げられる。被検液中の非特異物質の吸着を防ぐために、不溶性担体の表面処理を適宜行ってもかまわない。この表面処理の例としては、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、スキムミルク等によるコーティングが挙げられる。

【0016】「負または正に荷電した不溶性の担体（帯電固相）」とは、水溶液中で、正又は負に荷電する不溶性担体の総称であり、帯電特異的結合物質に導入された帯電性基（正又は負の帯電性基）と静電的相互作用するための帯電性を有するものである。帯電固相は、不溶性担体の樹脂自体が帯電していてもよいが、一般的には帯電性基で修飾された不溶性担体を用いる。市販のイオン交換用樹脂を用いれば、表面の電荷も均一でそのまま担体として使用できるので好適である。このようなイオン交換樹脂としては、陰イオン帯電担体としてはカルボキシルメチル基、スルホン酸基、カルボキシル基、リン酸基

等を有するものが、陽イオン帯電担体としてはジエチルアミノエチル（DEAE）基、アミノ基、アミノエチル基、グアニジル基、ジメチルアミノプロピル基、（第4級）ポリエチルイミン基等を有するものが代表的である。また、担体上のアミノ基やカルボキシル基等を介して直接帯電性基を導入しても、いったんウシ血清アルブミンのようなキャリア物質を被覆した後に、この物質に帯電性基を導入しても良い。N-サクシニミジルマレイミドカルボキシレート、N-サクシニミジルピリジルチオカルボキシレート等の介在物質（スパーサー）を介して間接的に導入する方法は反応性を高めるための好適な被覆法の一つである。

【0017】「固定化反応溶液」とは、測定対象物質と帯電特異的結合物質との複合体（帯電複合体）を帯電固相に固定化するための反応溶液を意味する。反応条件には特に制限は無く、反応液のpHとイオン強度については、適宜最適条件を求めることができる。しかし、先述のように被検液中には、通常、測定すべき物質の他に様々な電荷をもつ夾雑物質が共存しており、これら夾雑物質のもつ電荷が帯電特異的結合物質と固相との静電的結合に干渉する可能性が有る。よって、夾雑物質の干渉（帯電固相への結合）を受けないためには、固定化反応溶液のイオン強度を帯電特異的結合物質と固相との静電的結合には影響しない範囲でできるだけ高く設定することが好ましい。例えば、中性の固定化反応溶液（ $pH=6.0\sim 8.0$ ）を用いる場合には、 $pK_a=4$ 以下の帯電特異的結合物質と $pK_b=9$ 以上の帯電固相を用いることが好ましく、その場合には、 $0.2\sim 0.8$ のイオン強度が好適である。 $0.3\sim 0.5M$ のNaClを含む緩衝液は特に好ましい固定化反応溶液である。

【0018】「標識」とは、当該分野（生化学的測定方法）で用いられる標識を意味し、酵素、放射性物質、蛍光物質、発光物質、金属化合物等が挙げられる。酵素としては β -D-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ等が、放射性物質としては¹²⁵I等が、蛍光物質としてはフルオレセインイソチオシアネート等が、発光物質としてはアクリジニウム塩、エクオリン等が、金属化合物としてはユーロピウム³⁺等が代表例である。これらの標識を蛋白質や核酸などの特異的結合物質に導入する手法は自体公知であり、当業者であれば容易に実施できる技術である。

【0019】「解離反応溶液」とは、測定対象物質と帯電特異的結合物質との複合体（帯電複合体）を帯電固相から解離させるための反応溶液を意味し、免疫複合体転移測定法など、いったん測定対象物質を含む複合体を固相から解離させる場合に用いられる。この解離反応溶液の組成に特に制限は無く、pHとイオン強度等、適宜最適条件を求めることができる。解離した溶液中の複合体量の測定を行う場合、固相から帯電複合体を解離させるのに十分な強さで且つ導入された標識の測定に影響を与えな

い範囲であればよく、また、解離させた免疫複合体を次の固相に結合させて測定する場合は、固相から帯電複合体を解離させるのに十分な強さで且つ複合体間の結合は解離させず、次の固相への結合反応にも影響を与えない範囲のイオン強度が選択されればよい。通常は、0.5～3のイオン強度が選択される。1～2MのNaClを含む緩衝液は、特に好ましい解離反応溶液である。このほか、帯電特異的結合物質に導入された帯電性基が電荷を失うような塩基性あるいは酸性の緩衝液を用いて、系のpHを変え、複合体を解離させることも可能である。

【0020】（方法の説明）以下に本発明の固定化方法を応用したサンドイッチ法イムノアッセイを例に解説する。

（1）帯電特異的結合物質の調製

帯電特異的結合物質の調製は、一般的な蛋白質の修飾技術により行うことができる。例えば、特異的結合物質のアミノ基やカルボキシ基、SH基等に直接あるいは、N-サクシニミジルマレイミドカルボキシレート、N-サクシニミジルピリジルチオカルボキシレート等の介在物質（スパーサー）を介して、（スルホーレーチロシン）₄などのスルホン酸残基を有する物質を導入する。このほか、遺伝子組換えの手法を用いることにより、特異的結合物質となるタンパク自体に帯電性のアミノ酸あるいは核酸残基を複数個付加して発現させることも可能である。この様にして調製した「帯電特異的結合タンパク」は、クロマトグラフィーや凍結乾燥等、適当な手法にて精製および保管でき、随時本発明の固定化方法および診断方法に用いることができる。また、帯電特異的結合物質を帯電固相と静電的に結合させたものを予め調製しておき、要事、測定対象物質と結合させることもできる（工程（A'））。このような態様で用いる「帯電特異的結合物質固定化担体」もイオン結合クロマトグラフィーやアフィニティークロマトグラフィーの分野で自他公知の手法にて、製作および保管できる。

【0021】（2）帯電複合体の形成および固定化

測定対象物質を含む被検液、帯電固相および帯電特異的結合物質を固定化反応溶液中で反応させ、帯電複合体を帯電固相上に形成させる工程（A）または（A'）は、通常のイムノアッセイで繁用される固定化と同様の条件で行われる。測定対象物質と結合させる帯電特異的結合物質の種類および数は特に限定されず、その後の形成された複合体と担体との結合様式に合わせて自由にその種類や数を選択すればよい。後述するように特異的標識物質を用いて形成された複合体を検出する系では測定対象物質1分子に対して帯電特異的結合物質は1分子で足りるし、凝集反応により複合体を検出するような系では、測定対象物質1分子に対して通常複数の帯電特異的結合物質が結合するように調整される。

【0022】（3）標識化

固相に結合された測定すべき物質を含む複合体の検出方法についても特に制限はなく、従来、物質の検出に使用

されてきた方法を適応すればよい。なかでも、適当な標識化合物を用いて検出する方法は最もよく使用される方法である。例えば、帯電特異的結合物質とは別に、測定すべき物質と特異的に複合体を形成する活性を有し且つあらかじめ標識化合物が導入された物質（特異的標識物質）を反応させることによって達成されてもよいし、また、測定対象物質と特異的複合体を形成する帯電特異的結合物質に、あらかじめ標識化合物を導入しておいてもよい。測定対象物質と特異的標識物質とを反応させる場合、その反応は、測定対象物質と帯電特異的結合物質からなる複合体を担体に捕捉する前でも捕捉された後でも構わないが、操作の簡便性を考えると、反応溶液で同時に〔帯電特異的結合物質－測定対象物質－特異的標識物質〕なる複合体を形成させた後に担体に捕捉する方法がより好ましい。

【0023】（応用）本発明の固定化方法および測定方法は、原則的に、特異的結合反応を用いる生化学的測定全てに応用できる。すなわち、本発明を使用する測定系は、特に限定されず、ホモジニアス系でもヘテロジニアス系でもよい。また、凝集法、サンドイッチ法イムノアッセイ（免疫複合体転移測定法を含む）、競合法イムノアッセイ、核酸ハイブリダイゼーションアッセイなど応用は多岐にわたる。また、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）などの遺伝子増幅方法において、プローブに帯電性基を導入し、遺伝子増幅後、帯電固相への固定化に用いることもできる。

（A）競合法

競合法に適用する場合、帯電特異的結合物質に対して測定すべき物質と競合する成分が測定系に添加される。例えば、被検液中の抗原物質を測定する場合、帯電性基が導入された抗体（帯電特異的結合物質）に対して、あらかじめ標識が導入された抗原物質と被検液中の抗原物質とを溶液中で競合反応させた後、得られた複合体を帯電固相に結合させて、その標識量を測定することにより被検液中の抗原物質量が算出される。

【0024】（B）凝集法

凝集法に適用する場合、測定対象物質に対して溶液中で複数の帯電特異的結合物質を結合させた後、あらかじめ表面を帯電特異的結合物質と静電的に結合する物質で被覆したラテックス等の微粒子を反応液に添加することにより、測定すべき物質量に応じた微粒子の凝集反応が惹起される。形成された凝集量は、一般に反応液の濁度、吸光度、偏光度の変化等で観察される。

【0025】（C）免疫複合体転移測定法及びその改良法
免疫複合体転移測定法に適用する場合には、免疫複合体を第1固相へ捕捉するまでのステップは、基本的にはこれまでに述べてきた方法と同様に、被検液中の測定対象物質に対して反応溶液中で〔帯電特異的結合物質－測定対象物質－特異的標識物質〕なる複合体を形成させた後に固相に捕捉させればよい。あるいは、別の方法とし

て、あらかじめ担体表面上に静電的結合された帯電特異的結合物質に対して被検液中の測定対象物質および特異的標識物質を反応させて、固相表面上で〔帯電特異的結合物質－測定対象物質－特異的標識物質〕なる複合体を形成させてもよいし、さらには、一旦別の固相上で形成させた複合体〔帯電特異的結合物質－測定対象物質－特異的標識物質〕を解離させた後に捕捉しても構わない。また、測定対象物質を含んで形成される複合体中のいずれかの成分と特異的に結合し且つ溶液中で正または負の荷電を示す帯電性基が導入された物質（間接的帯電特異的結合物質）をあらかじめ該帯電性基の持つ電荷を利用した静電気的作用を介して固相上に結合させておき、間接的帯電特異的結合物質を介して、測定対象物質を含む複合体を固相上に捕捉させてもよい。このような間接的帯電特異的結合物質を用いる例としては、特異的結合物質にビオチンを導入しておき、測定対象物質と特異的結合物質で形成された複合体を、帯電性基を介してあらかじめ固相に結合させたアビジン（またはストレプトアビジン）で捕捉する方法、あるいは特異的結合物質にハプテンを導入しておき、形成された複合体を、帯電性基を介してあらかじめ固相に結合させた抗ハプテン抗体で捕捉する方法等が挙げられる。また、この場合も、一旦別の固相上で形成させた、測定対象物質を含む複合体を解離させた後に、該複合体を間接的帯電特異的結合物質を介して固相上に捕捉させても構わない。

【0026】その後、固相上に捕捉された免疫複合体は、その固相を適当なイオン強度をもつ溶液と接触させることにより速やかに解離させることができる。このときのイオン強度は、解離した溶液中で複合体量の測定を行う場合は、固相から免疫複合体を解離させるのに十分な強さで且つ導入された標識の測定に影響を与えない範囲のイオン強度であればよく、また、解離させた免疫複合体を次の固相に結合させて測定する場合は、固相から免疫複合体を解離させるのに十分な強さで且つ複合体間の結合は解離させず、次の固相への結合反応にも影響を与えない範囲のイオン強度が選択されればよい。通常は、0.5～3.0のイオン強度が選択される。

【0027】第1の固相から解離された免疫複合体を第2の固相に捕捉する方法は、従来の免疫複合体転移測定法で使用方法を用いてもよいし、本発明の技術を再び適用してもよい。本発明の技術を再び適用する方法の例としては、第1固相からの解離に使用されたイオン強度下でも複合体中の帯電特異的結合物質と静電的相互作用を有するような第1固相よりもさらに強い電荷を持つ帯電性基が表面に被覆された固相を第2固相として用いる方法や第1固相から複合体を解離した溶液を希釈、ゲル濾過、透析などして、溶液のイオン強度を低くしてから第2固相と静電反応させる方法等が挙げられる。固相から解離された複合体の溶液中での測定や、あるいは次の固相への結合させた後の測定については、従来免疫複合

体転移測定法あるいはその改良法で用いられている方法を使用すればよい。

【0028】

【実施例】以下、本発明の有用性を説明するために、実施例として血清中のHIV-1, p24抗原の固相捕捉後の測定、固相に捕捉されたHIV-1, p24抗原を含む免疫複合体の当該固相からの解離反応および固相に捕捉されたHIV-1, p24抗原を含む免疫複合体を当該固相から解離させて別の固相に転移させた後の測定を本発明法を用いて行い、従来技術と比較した例を示す。

【0029】実施例1

本実施例では、本発明の特徴を直接的に示すために、被検液中のHIV-1, p24抗原の固相捕捉後の測定を本発明の方法により行った。各物質の精製・調製の詳細、および実験手順の詳細は以下の通りである。

〔緩衝液〕本実験では、以下の緩衝液を主に使用した。緩衝液A：0.01 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH7.0、1 g/L ウシ血清アルブミン（フラクションV、インターゲン社、ニューヨーク）、1 mmol/L 塩化マグネシウム及び1 g/L アジ化ナトリウム

【0030】〔遺伝子組替えHIV-1, p24 (rp24) の調製〕遺伝子組替えHIV-1, p24 (rp24) は、遺伝子組替えHIV-1, p17を調製する公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス (J. Clin. Lab. Anal.)、第12巻、第179-189頁 (1998)〕に準じて、HIV-1単離株由来のDNAからポリメラーゼ鎖反応法 (PCR法) で増幅させたp24 DNA断片をプラスミドに導入し、マルトース結合蛋白 (MBP) との融合蛋白質として大腸菌で発現させ、その後各種蛋白精製法を用いて精製した後に、ロッシュ社（バーゼル、スイス）のキットを用い、同社の操作手順に従って、ビオチニルXa因子によるrp24とMBPの切断およびストレプトアビジンカラムによるビオチニルXa因子の除去を行って調製した。精製したrp24の純度は電気泳動法にて確認した。

【0031】〔L-アラニン-（スルホ-L-チロシン）₄-抗HIV-1, p24 Fab' の調製〕抗HIV-1, p24ポリクローナル抗体は、既報〔橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクrobiology (J. Clin. Microbiol.)、第33巻、第298-303頁 (1995)〕の方法でウサギをrp24により免疫して作成し、得られた抗血清より公知の方法〔橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクrobiology (J. Clin. Microbiol.)、(1995)、(前出)〕でFab'を調製した。続いて、抗HIV-1, p24 Fab'、1.4 mg (30 nmol) とγ-マレイミド・ブチリル-L-アラニン-（スルホ-L-チロシン）₄（ペプチド研究所、大阪）、0.7 mg (420 nmol) を5 mmol/LのEDTAを含む0.1 mol/L リン

酸ナトリウム緩衝液, pH 6.0、0.7 mL中で室温にて1時間反応させ、0.1 mol/Lの塩化ナトリウムを含む0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0にてゲルろ過して調製した。

【0032】〔マウスモノクローナル抗HIV-1, p 24 Fab' -β-D-ガラクトシダーゼの調製〕マウス抗p 24モノクローナル抗体は、イノジェネティクス社 (Inogenetics、ベルギー) から購入し、既報〔橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス (J. Clin. Lab. Anal.)、第10巻、第302-307頁 (1996)〕の方法により調製した。

【0033】〔β-D-ガラクトシダーゼの活性測定〕β-D-ガラクトシダーゼの測定は、4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシドを基質とする公知の方法〔今川ら、アンナリス・クリニカル・バイオケミストリー (Ann. Clin. Biochem.)、第21巻、第310-317頁 (1984)〕で反応させ、生成した4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度を分光蛍光光度計 (RF-510、島津製作所、京都) で測定した。蛍光値は、 1×10^{-8} mol/Lの4-メチルウンベリフェロンを含む0.1 mol/L グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液, pH 10.3の示す蛍光強度を100として補正を行った。

【0034】〔被検液中のHIV-1, p 24抗原の測定〕0 amolあるいは500 amolのrp 24抗原、100 fmolのL-アラニン- (スルホ-L-チロシン)₄-抗HIV-1, p 24 Fab' および10 fmolのマウスモノクローナル抗HIV-1, p 24 Fab' -β-D-ガラクトシダーゼを含む緩衝液A (50 μgの不活性β-D-ガラクトシダーゼ (ムテイン、ロッシュ社)、50 μgの非特異マウスIgG及び0.4 mol/L 塩化ナトリウムを含む)、100 μL中にて、室温で3時間反応させた。続いて、これをジエチルアミノエチルセファロース (DEAE-Sepharose) イオン交換樹脂固相 (ファルマシア LKB・バイオテクノロジー社、スウェーデン) と混合し、室温で5分間攪拌させた後、固相を0.4 mol/Lの塩化ナトリウムを含む緩衝液A、200 μLで3回洗浄し 固相に結合したβ-D-ガラクトシダーゼの活性を10分間反応で測定した。固相は、0.4 mol/L 塩化ナトリウムおよび0.2 g/L アジ化ナトリウムを含む10 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0にて平衡化したDEAE-Sepharoseを同緩衝液にて10倍容に懸濁し、その30 μLの遠心ペレットを用いた。さらに、反応液中の52.5 μLの緩衝液Aの代りに2.5 μLの5 mol/L 塩化ナトリウムと50 μLの健常人血清を含む条件で同様の実験を行った。血清の添加無し、有りの各条件におけるrp 24、0 amolと500 amol含有時の固相に結合したβ-D-ガラクトシダーゼの活性測定値を表1に示す。

【0035】比較例1

本比較例では、実施例1と同じく被検液中のHIV-1, p 24の測定を従来の2,4-ジニトロフェニル基と抗

2,4-ジニトロフェニル基抗体の反応を利用して複合体を固相に捕捉する方法を用いて行った。各物質の精製・調製の詳細および実験手順の詳細は下記以外は実施例1に記載した通りである。

〔アフィニティー精製抗2,4-ジニトロフェニル基IgG不溶化ポリスチレンボールの調製〕ウサギ抗2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン抗体 (IgG) 溶液を2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンカラムに吸着後、pH 2.5で溶出する公知の方法〔河野ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス (J. Clin. Lab. Anal.)、第2巻、第209-214頁 (1988)〕でアフィニティー精製した抗2,4-ジニトロフェニル基IgGを既報〔石川および加藤、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Scand. J. Immunol.)、第8巻 (補7)、第43-55頁 (1978)〕の方法に従い、ポリスチレンボール (直径6.35 mm、イムノケミカル社、岡山) に不溶化した。用いた溶液のIgG濃度は10 μg/mLであった。

【0036】〔2,4-ジニトロフェニル-ビオチン-ウシ血清アルブミン-アフィニティー精製抗HIV-1, p 24 Fab' の調製〕アフィニティー精製抗HIV-1, p 24 Fab' に、2,4-ジニトロフェニル-ビオチン-ウシ血清アルブミンを反応させる公知の方法〔橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス (1996)、(前出)〕で、2,4-ジニトロフェニル-ビオチン-ウシ血清アルブミン-アフィニティー精製抗HIV-1, p 24 Fab' を調製した。

【0037】〔被検液中のHIV-1, p 24抗原の測定〕0 amolあるいは500 amolのrp 24抗原、50 μgの不活性β-D-ガラクトシダーゼ、100 fmolの2,4-ジニトロフェニル-ビオチン-ウシ血清アルブミン-アフィニティー精製抗HIV-1, p 24 Fab'、10 fmolのマウスモノクローナル抗HIV-1, p 24 Fab' -β-D-ガラクトシダーゼおよび0.1 mol/Lの塩化ナトリウムをそれぞれ含む緩衝液A、90 μLと非特異ウサギ血清10 μLを、13.3×54 mmのテストチューブに添加し、室温で3時間反応させた。続いて、同テストチューブにアフィニティー精製抗2,4-ジニトロフェニル基IgG不溶化ポリスチレンボール固相1個を添加し、振とうしながら室温で30分反応させた後、固相を0.1 mol/L塩化ナトリウムを含む緩衝液A、2 mLで2回洗浄し 固相に結合したβ-D-ガラクトシダーゼの活性を10分間反応で測定した。さらに、同様の実験を反応液中に50 μLの健常人血清を含む条件で行った。血清の添加無し、有りの各条件におけるrp 24、0 amolと500 amol含有時の固相に結合したβ-D-ガラクトシダーゼの活性測定値を実施例1の結果とあわせて表1に示す。従来法で血清共存サンプルを測定した場合 (比較例1)、血清を含まないサンプルに対し反応効率は45%に低下する。一方、本発明方法では、血清による反応効率低下は認められなかった (実

施例 1 : 反応効率 100%)。

【0038】

【表 1】

表 1. 本発明法と従来法での血清存在下での反応効率の比較

実験	抗体	固相	検体血清 の添加 (μ L)	固相に結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性の 10分間測定による相対強度			
				rp24 (amol/tube)		特異的信号 (P)-(0)	血清存在下 での反応 効率 (%)
				0 (0)	500 (P)		
実施例 1	スルホニ化 抗 HIV-1, p24 Fab' *	DEAE- Sephacrose	0	15	609	594	(100)
			50	28	620	592	100
比較例 1	DNP 化 抗 HIV-1, p24 Fab' **	抗 DNP 抗体 結合ポリスチレン ビーズ	0	120	915	795	(100)
			50	3	383	360	45

* : L-アラニン-(スルホ-L-チロシン)₄-抗 HIV-1, p24 Fab'

** : 2,4-ジニトロフェニル-ビオチニル-ウシ血清アルブミン-アフィニティー精製抗 HIV-1, p24 Fab'

DNP: 2,4-ジニトロフェニル基

【0039】 実施例 2

本実施例では、特定物質を超高感度に測定する技術である免疫複合体転移測定法 [E. Ishikawa, "Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay"; Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol.27, (1999), Ed.:S.Pillai and P.C.van der Vliet, Elsevier, Amsterdam, (前出)] においても、本発明法の適用が有効であることを示すため、免疫複合体転移測定法による HIV-1, p24 抗原測定系において、免疫複合体を第一の固相に捕捉後、該固相から解離させる工程までを本発明法の技術を用いて行った。各物質の精製・調製の詳細および実験手順の詳細は下記以外は先に記載した通りである。

[L-アラニン-(スルホ-L-チロシン)₄-抗 HIV-1, p24 Fab', rp24 抗原およびマウスモノクローナル抗 HIV-1, p24 Fab' - β -D-ガラクトシダーゼからなる複合体の DEAE イオン交換樹脂固相からの解離] 500 amol の rp24 を用いて実施例 1 の β -D-ガラクトシダーゼ活性測定前までと同様の操作を行い、DEAE イオン交換樹脂固相上に、L-アラニン-(スルホ-L-チロシン)₄-抗 HIV-1, p24 Fab', rp24 抗原およびマウスモノクローナル抗 HIV-1, p24 Fab' - β -D-ガラクトシダーゼからなる複合体を結合させた。続いて、同固相を 2.0 mol/L の塩化ナトリウムを含む緩衝液 A、100 μ L 中に懸濁し、1分、3分及び5分間攪拌させた後に、溶液と固相を分離し、溶液に含まれる複合体中の β -D-ガラクトシダーゼの活性を10分間反応で測定した。そして、最初の固相に結合していた複合体中の β -D-ガラクトシダーゼ活性と溶液中の複合体の β -D-ガラクトシダーゼ活性から、最初固相に結合していた複合体のうち溶液中に解離された複合体の割合を求めた。それぞれのインキュベーション時間における解離の割合 (%) を図 1 に示す。

【0040】 比較例 2

本比較例では、免疫複合体転移測定法による HIV-

1, p24 抗原測定系において、免疫複合体を第一の固相に捕捉後、該固相から解離させる工程までを従来の 2, 4-ジニトロフェニル基と抗 2, 4-ジニトロフェニル基抗体の反応を利用して実施する方法を用いて行った。各物質の精製・調製の詳細および実験手順の詳細は下記以外は先に記載した通りである。

[2,4-ジニトロフェニル-ビオチニル-ウシ血清アルブミン-アフィニティー精製抗 HIV-1, p24 Fab', rp24 抗原およびマウスモノクローナル抗 HIV-1, p24 Fab' - β -D-ガラクトシダーゼからなる複合体のアフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶化ポリスチレンボール固相からの解離] 500 amol の rp24 を用いて比較例 1 の β -D-ガラクトシダーゼ活性測定前までと同様の操作を行い、アフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶化ポリスチレンボール固相上に、2,4-ジニトロフェニル-ビオチニル-ウシ血清アルブミン-アフィニティー精製抗 HIV-1, p24 Fab', rp24 抗原およびマウスモノクローナル抗 HIV-1, p24 Fab' - β -D-ガラクトシダーゼからなる複合体を結合させた。続いて、同固相を 2 mM の ϵ N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン及び 0.1 mol/L の塩化ナトリウムを含む緩衝液 A、150 μ L 中で、2分、4分及び6分間振とうインキュベーションさせた後に溶液と固相を分離し、固相上に残った複合体中の β -D-ガラクトシダーゼの活性を10分間反応で測定した。そして、最初の固相に結合していた複合体中の β -D-ガラクトシダーゼ活性と固相上に残った複合体の β -D-ガラクトシダーゼ活性から、実施例 2 と同様、最初固相に結合していた複合体のうち溶液中に解離された複合体の割合を求めた。それぞれのインキュベーション時間における解離の割合 (%) を実施例 2 の結果と合わせて図 1 に示す。帯電性基を用いる本発明の方法 (実施例 2) では、DNP-DNP 抗体を用いた系より解離速度が増加しており、1 分間のインキュベーションで 90% 近くの複合体が固相から解離された。免疫複合

体転移法での複合体の解離工程が極めて迅速かつ効率的に行えることを示すものである。

【0041】実施例 3

本実施例では、本発明による血清の影響を受けない免疫複合体の固相への捕捉および免疫複合体の固相からの迅速な溶出が、特定物質の測定の超高感度化に有効であることを示すために、免疫複合体を第一の固相に捕捉後、該固相から解離させて第二の固相に捕捉して、免疫複合体中の標識を測定するまでの工程を続けて行った。実施に必要な材料の調製、実験手順等の詳細は、下記以外は先に記載した通りである。

〔アフィニティー精製ヤギ（抗ウサギ IgG）IgG 不溶化ポリスチレンチューブの調製〕公知の方法〔河野ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス（1988）、（前出）〕によりアフィニティー精製したヤギ（抗ウサギ IgG）IgG を 250 μ g 含む溶液、5 mL を用いて、公知の方法〔石川および加藤、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー、（1978）、（前出）〕によりポリスチレンチューブ（25 \times 100 mm）の内面に不溶化して調製した。

【0042】〔被検液中の HIV-1, p 24 抗原の測定〕0 amol あるいは 500 amol の rp 24 を用いて、ヒト血清 5

0 μ L の存在する条件下で、実施例 2 と同様の操作により、2.0 mol/L 塩化ナトリウムを含む緩衝液 A、100 μ L を用いて免疫複合体を DEAE イオン交換樹脂から解離させる工程を 2 分間実施した。続いて、溶出液 100 μ L を塩化ナトリウムを含まない緩衝液 A、500 μ L および非特異マウス IgG、100 μ g/5.4 μ L と混合した後、アフィニティー精製ヤギ（抗ウサギ IgG）IgG 不溶化ポリスチレンチューブに添加し、チューブを回転させることにより、反応液をチューブ内面の抗体結合面全体と 20 分間反応させた。反応後、ポリスチレンチューブの内面を緩衝液 A、5 mL で 2 回洗浄した後、チューブの内面に結合した β -D-ガラクトシダーゼの活性を 200 分間反応で測定した。結果を実施例 1 の結果と合せて、表 2 に示す。反応効率の良い本発明の固定化方法を応用した免疫複合体転移法（本発明の他の態様）では、バックグラウンド蛍光が殆どゼロになる一方（560 \rightarrow 2.2）、総信号量は約半分弱に維持されている（12400 \rightarrow 4920）。もともと夾雑物質存在下でも高い感度を提供できる免疫複合体転移法の特徴が総信号量の増加により更に十分に発揮されている（感度 106 倍向上）。

【0043】

【表 2】

表 2. 本発明法の免疫複合体転移法による HIV-1, p 24 抗原測定の超高感度効果

実験	免疫複合体転移の有無	200 分間測定による β -D-ガラクトシダーゼ活性の蛍光強度			
		rp24 (amol/tube)		感度 (P)-(N) (N)	(P)-(N) (N) の比
		0 (N)	500 (P)		
実施例 1	無	560	12400	21	1
実施例 3	有	2.2	4920	2,235	106

【0044】

【発明の効果】上記実施例 1～3 および比較例 1、2 によって、以下の 3 点が確認できた。

(1) 本願発明法における血清検体中での反応効率の向上効果

被検液中の測定すべき物質を含む複合体を固相上に形成させた後に、該固相上で複合体量を測定する方法において、本発明法を用いると、血清成分のような夾雑物質が大量に存在する条件下でも、従来技術のように非存在下条件に対して反応効率を減じることなく、反应用液中の測定すべき物質を含む複合体を非存在下条件と同様の効率で固相に捕捉でき、特異的信号量が増大することが確認された。

(2) 免疫複合体転移測定法における免疫複合体の第一固相からの解離速度向上効果

免疫複合体転移測定法において本発明法を用いると、上

記 (1) の効果に加えて、第一固相に捕捉された免疫複合体の解離の速度が、従来技術に比べて顕著に向上し、それゆえ免疫複合体転移測定法全体における反応時間を短縮できることが確認された。

(3) 免疫複合体転移測定法における迅速な超高感度測定効果

免疫複合体転移測定法において本発明法を用いると、血清成分の干渉を受けずに且つ迅速な反応条件で、免疫複合体転移測定法の最大の特徴である超高感度測定が可能であることが確認された。

【0045】

【図面の簡単な説明】

【図 1】固相上に形成された、HIV-1, p 24 抗原を含む免疫複合体を固相から解離させる反応において、本発明技術と従来技術それぞれの反応時間と解離率の関係を示す図である。

【図1】

図1 免疫複合体の固相からの解離反応における
本発明法と従来法の解離速度の比較

